

PCT
WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07K 1/04	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/13084 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum : 5. September 1991 (05.09.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/00318 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Februar 1991 (20.02.91)		(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM KG; Postfach 200, D-6507 Ingelheim am Rhein (DE).
(30) Prioritätsdaten: P 40 05 518.3 22. Februar 1990 (22.02.90) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.
(71) Anmelder (nur für AU CA GB): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-6507 Ingelheim am Rhein (DE). (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser AU CA GB US): BOEHRINGER INGELHEIM KG [DE/DE]; Postfach 200, D-6507 Ingelheim am Rhein (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHNORRENBERG, Gerd [DE/DE]; Ernst-Ludwig-Str. 66a, D-6535 Gau-Algesheim (DE). KNAPP, Wilhelm [DE/DE]; Winzerstr. 5, D-6537 Gensingen (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR THE SIMULTANEOUS SYNTHESIS OF SEVERAL POLYPEPTIDES (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR SIMULTANEN SYNTHESE MEHRERER POLYPEPTIDE		
(57) Abstract <p>Process and device for the fully automatic simultaneous synthesis of several polypeptides, in which up to 48 different polypeptides may be synthesized in an automatic pipette by the solid-phase method of synthesis. The device has individual reaction vessels for the synthesis of the individual polypeptides which are brought together to form one unit by a holding device. The simultaneous extraction of the fluids from the reaction vessels after each reaction or washing process takes place via the holding device.</p>		
(57) Zusammenfassung <p>Verfahren und Vorrichtung zur vollautomatischen simultanen Synthese mehrerer Polypeptide, wobei bis zu 48 verschiedene Polypeptide in einem Pipettier-Roboter nach der Festphasensynthese-Methode synthetisiert werden. Die Vorrichtung weist individuelle Reaktionsgefäße für die Synthese der einzelnen Polypeptide auf, die durch eine Haltevorrichtung zu einer Einheit zusammengefaßt werden. Über die Haltevorrichtung erfolgt das gleichzeitige Absaugen der Flüssigkeiten aus den Reaktionsgefäßern nach jeder Umsetzung beziehungsweise nach jedem Waschen.</p>		

Verfahren und Vorrichtung zur simultanen
Synthese mehrerer Polypeptide

Für die schnelle Evaluierung von Struktur-Wirkungsbeziehungen an biologisch aktiven Peptiden durch Rezeptor-Bindungs-Studien und die schnelle Epitop-Ermittlung für die Immunologie bei Peptiden und Proteinen werden relativ kleine Mengen (unter je 20 mg) einer Vielzahl von Peptiden benötigt. Die Herstellung dieser Peptide erfolgt zweckmäßig nach der Festphasenpeptidsynthese. Diese Synthese basiert auf der von R.B. Merrifield entwickelten Methode (G. Barany, R.B. Merrifield in *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2, 3-284 (1980), Hrsg, Gross, Meienhofer Academic Press, New York), bei der die Peptidkette schrittweise aufgebaut wird. Die Syntheseschritte können wie folgt zusammengefaßt werden:

- a) Binden der ersten Aminosäure der Peptidkette über eine Ankergruppe an einen polymeren Träger,
- b) schrittweises Ankondensieren der übrigen Aminosäuren der Peptidkette,
- c) Zwischenschritte zwischen den einzelnen Kondensationen bestehend aus Waschen, Abspalten von Schutzgruppen und Neutralisieren,
- d) gewünschtenfalls acylieren endständiger Aminogruppen,
- e) Abspalten des Peptids vom Träger.

Bei dieser Peptidsynthese muß mit einer Synthesesezeit von bis zu 18 Stunden, meist bis zu 4 Stunden pro Aminosäure gerechnet werden. (Die einzelnen

Kondensationen benötigen meist 1 bis 2 Stunden Reaktionszeit; zwischen den Kondensationen sind in der Regel etwa 10 Zwischenschritte erforderlich, für die je ca. 2 bis 15 Minuten gerechnet werden müssen.) Die Herstellung von Peptiden bestehend aus einer größeren Anzahl von Aminosäuren ist somit sehr langwierig, arbeitsintensiv und teuer.

Für die Festphasensynthese analoger Peptide ist von R. A. Houghten (Proc. Natl. Acad. Sci, USA, Vol. 82, pp. 5131-5135, August 1985, Immunology) eine Methode beschrieben worden. Danach wird der polymere Träger für die Synthese in Portionen von je 50-100 mg in kleine poröse Polypropylenbeutel gefüllt, die Beutel werden zugeschmolzen, die in den Synthesen einheitlichen Zwischenschritte (Waschen, Neutralisieren, Abspalten von Schutzgruppen) werden an allen Beuteln gleichzeitig in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß ausgeführt, die einzelnen Kondensationen werden getrennt ausgeführt. Die Methode kann manuell oder teilweise automatisiert unter Verwendung eines Peptidsynthesizers ausgeführt werden.

Der Nachteil der beschriebenen Methode liegt darin, daß die Handhabung der Beutel etwas umständlich ist, daß die Beutel nicht wieder verwendet werden können, daß für die Kondensationen der verschiedenen Peptide die Beutel voneinander getrennt werden müssen und keine Kontrollproben während der ganzen Synthese entnommen werden können.

In der deutschen Patentanmeldung Nr. P 38 28 576.2 und in der Veröffentlichung G. Schnorrenberg und H. Gerhardt, Tetrahedron Vol. 45, No. 24, 7759-7764, 1989 wird ein Verfahren und eine Vorrichtung beschrieben, die die automatische simultane Synthese mehrerer Polypeptide

ermöglicht und die oben genannten Nachteile vermeidet. Danach wird die bereits erwähnte Festphasensynthese-Methode so abgewandelt, daß sie mit Hilfe eines entsprechend angepaßten Pipettier-Roboters ausgeführt werden kann. Pipettier-Roboter sind bis jetzt für Serienanalysen verwendet worden. Zum Beispiel ist ein Pipettier-Roboter der Firma TECAN, RSP 5052, verwendbar. Pipettier-Roboter weisen folgende äußere Bestandteile auf: Mindestens einen Arm mit Dosierpipette, eine Halterung mit Vorratsgefäßen sowie eine Mikrotiterplatte die bis zu 96 Wells enthalten kann. Der Arm des Roboters bringt die Reagenzien aus den Vorratsgefäßen in die jeweiligen Wells der Mikrotiterplatte ein und saugt bei Bedarf Flüssigkeiten aus den Wells ab. Die Kanüle der Dosierpipette kann auch so ausgebildet sein, daß sie durch eine von oben nach unten laufende Trennwand in zwei Teile geteilt ist. (Durch diese geteilte Kanüle ist es möglich, zwei verschiedene Zudosierungen oder eine Zudosierung und eine Absaugung mit einem Arm auszuführen) Der Arbeitsablauf des Gerätes wird durch ein Computerprogramm gesteuert. Nach der genannten deutschen Patentanmeldung Nr. P 38 28 576.2 erfolgt die Festphasenpeptidsynthese in einem solchen Pipettier-Roboter wie folgt: In den Wells einer Mikrotiterplatte wird Trägermaterial (vorzugsweise granulierte Trägermaterial) vorgelegt. Das Trägermaterial kann mit dem Anfangsteil des jeweils gewünschten Peptids beladen sein. Die für die Reaktionen und Waschschrifte benötigten Flüssigkeiten werden in den Vorratsgefäßen des Gerätes bereitgestellt. Soll am Ende der Synthese das Peptid vom Träger getrennt werden und/oder sollen freie Aminogruppen acyliert werden, so sind auch für diese

Reaktionen die erforderlichen Reagenzien in den Vorratsgefäßen vorzubereiten. Aus den benötigten Reaktionszeiten ergibt sich, daß es zweckmäßig ist, eine Microtiterplatte zu verwenden, die nicht mehr als 96 Wells enthält. Dementsprechend können in einem Programmablauf maximal 96 verschiedene Polypeptide synthetisiert werden. Entsprechend dem Programm, das der Synthese dieser Peptide angepaßt worden ist, bringt der Roboter die Reagenzien und Waschflüssigkeiten in die einzelnen Wells ein und saugt nach der entsprechenden Verweilzeit die über dem Träger stehende Flüssigkeit jeweils ab. Anhand des zweiarmigen Pipettier-Roboters RSP 5052 der Firma TECAN wird das Verfahren und die nötige Anpassung des Gerätes an das Verfahren näher erläutert. Die Anwendung des Verfahrens ist jedoch nicht auf dieses Gerät beschränkt. Pipettier-Roboter anderer Bauart, insbesondere auch ein- oder mehrarmige Roboter können gemäß der vorliegenden Erfindung für das Verfahren angepaßt werden. Es wird eine Microtiterplatte mit 96 Wells gewählt. Ein Well faßt z. B. 10 mg Harz, das mit einer Aminosäure beladen sein kann, und etwas mehr als 300 µl Flüssigkeit. Diese Menge Harz entspricht etwa 5 µmol Aminosäure bzw. ist für die Herstellung von etwa 5 µmol Peptid geeignet. Übliche Trägermaterialien auf Polystyrol- oder Polyacrylamidbasis sind verwendbar. Es ist zweckmäßig, Peptide aufzubauen, die maximal 20 Aminosäuren enthalten. Die dafür benötigten Reagenzlösungen und Waschflüssigkeiten werden in den dafür vorgesehenen Vorratsgefäßen vorbereitet. Arm 1 des Gerätes ist mit einer Dosierpipette versehen, Arm 2 mit einer Absaugkanüle mit Spülvorrichtung. Diese Spülvorrichtung ist vorzugsweise mit einem separat stehenden

Vorratsgefäß für das verwendete Lösungsmittel verbunden. Die Synthese erfolgt nach dem im angeschlossenen PC vorgegebenen Programm. Mit Arm 1 erfolgt die Zudosierung sämtlicher Reagenzlösungen, die aus offenen Vorratsgefäßen entnommen werden. Bevor die Dosierpipette von einer Reagenzlösung zu einer anderen wechselt, wird die Dosierpipette in einer speziellen Spülposition mit Lösungsmittel gespült. Mit Arm 2 erfolgt über eine mit einem Filter versehene Kanüle das Absaugen der Reagenz- und Waschflüssigkeiten. Zur Verhinderung von Harzverlusten und Kontaminationen der benachbarten Wells wird die Außenseite dieser Kanüle nach jedem Absaugvorgang mit Lösungsmittel über eine an der Kanüle seitlich angebrachte Zuleitung gespült. Mit diesem Lösungsmittel wird gleichzeitig der nächste Waschvorgang begonnen. Anschließend wird die Kanüle in einer Kanülenspülposition abgespült. Für die Abtrennung des Peptids von Harz wird z.B. Trifluoressigsäure über Arm 1 in die Wells eingebracht. Nach erfolgter Abspaltung wird mit der Absaugkanüle die Lösung abgesaugt und in eine zweite Mikrotiterplatte überführt, aus der dann die Aufarbeitung erfolgt.

Die beschriebene Vorrichtung ermöglicht die automatische simultane Synthese mehrerer Polypeptide. Es ist jedoch unbefriedigend, daß damit das Absaugen der Flüssigkeiten nicht vollständig erfolgen kann, und daß relativ viel Zeit für das Absaugen der Reagentien und Waschflüssigkeiten verwendet werden muß. Die vorliegende Erfindung überwindet die genannten Nachteile. Ferner ist ohne Wechsel der Reaktionsgefäße auch die Synthese von bis zu 25 μ mol Peptid möglich.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur simultanen Synthese mehrerer Polypeptide nach der Festphasensynthesemethode, die mehrere Reaktionsgefäße und eine Haltevorrichtung für die Reaktionsgefäße aufweist, wobei die Reaktionsgefäße oben und unten offen sind, die untere Öffnung der einzelnen Reaktionsgefäße durch einen Filter abgedeckt ist, die Haltevorrichtung ein schließbares Gefäß ist, das eine Anschlußmöglichkeit für eine Inertgasszuleitung und eine Absaugvorrichtung aufweist sowie Öffnungen, in denen die Reaktionsgefäße so befestigt werden, daß deren obere Öffnungen von oben für das Zugeben der im Syntheseverfahren benötigten Flüssigkeiten zugänglich sind und deren untere Öffnungen mit dem Innenraum der Haltevorrichtung in Verbindung stehen.

Diese Vorrichtung kann in Verbindung mit zum Beispiel dem oben beschriebenen Pipettier-Roboter betrieben werden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur simultanen Synthese mehrerer Polypeptide nach der Festphasensynthesemethode unter Verwendung der oben beschriebenen Vorrichtung, bei dem polymeres Trägermaterial oder mit der ersten Aminosäure oder einem Peptid beladenes polymeres Trägermaterial in den Reaktionsgefäßen vorgelegt wird, dann nach der an sich bekannten Festphasensynthesemethode in den Reaktionsgefäßen die Peptide aufgebaut werden und gewünschtenfalls freie Aminogruppen und/oder Hydroxygruppen der Peptide acyliert werden und/oder anschließend die Peptide von ihrem Trägermaterial abgetrennt werden, indem die für die einzelnen Schritte erforderlichen Reagenzien beziehungsweise

Waschflüssigkeiten durch einen oder mehrere Roboterarm(e) mit Kanüle aus den entsprechenden Vorratsbehältern in die Reaktionsgefäße eingebracht werden und jeweils nach der benötigten Verweilzeit der Reagenzien beziehungsweise Waschflüssigkeiten die in den Reaktionsgefäßen oberhalb der Filter befindlichen Flüssigkeiten über die Haltevorrichtung gleichzeitig abgesaugt werden, wobei die einzelnen Schritte des Verfahrens durch das im Computer, der an den Roboter angeschlossen ist, vorgegebene Programm gesteuert werden. Eine bevorzugte Ausführung besteht darin, daß während des ganzen Syntheseverfahrens, ausgenommen sind nur die Phasen, in denen die Flüssigkeiten abgesaugt werden, Inertgas in die Haltevorrichtung eingeleitet wird, das unter so geringem Druck gehalten wird, daß es in den Reaktionsgefäßen nur das Durchsickern der Flüssigkeiten durch die Filter verhindert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung besteht die Haltevorrichtung aus einem wattenförmigen Gefäß mit plattenförmigem Deckel, wobei der Deckel Öffnungen aufweist, in denen je ein Reaktionsgefäß gehalten wird.

Geeignetes Material für die Haltevorrichtung und die Reaktionsgefäße ist z.B. Glas, Metall (vorzugsweise rostfreier Stahl), Polypropylen, Teflon oder Polyamid 66 oder eine Kombination dieser Materialien.

Die Haltevorrichtung und die Reaktionsgefäße müssen so aufeinander abgestimmt sein, daß die Reaktionsgefäße fest in der Haltevorrichtung ruhen. Das kann z.B. durch Einschrauben oder Einsticken der Reaktionsgefäße in die Haltevorrichtung erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung ist der Deckel der Haltevorrichtung mit entsprechenden konischen Öffnungen versehen und vorzugsweise aus Teflon oder Polyamid 66 hergestellt. Die Reaktionsgefäße sind zylinderische Glasbehälter, die in ihrem unteren Teil einen Glasschliff aufweisen, der in die Haltevorrichtung eingesteckt wird. Die Filter, die die unteren Öffnungen der Reaktionsgefäße abdecken, sind Glasfilterfritten oder Teflonfilterfritten. (Vorteilhaft ist es, Reaktionsgefäße zu verwenden, die im Boden je eine Bohrung aufweisen, in die die Teflonfilterfritte eingelegt beziehungsweise eingepreßt wird. Nach Beendigung eines Synthesecyclus können diese Fritten durch neue Fritten ersetzt werden.)

Wenn die erfindungsgemäße Vorrichtung mit dem genannten Pipettier-Roboter betrieben wird, ist es zweckmäßig die Vorrichtung mit maximal 48 Reaktionsgefäßen zu bauen.

Die Anwendung des Verfahrens ist jedoch nicht auf dieses Gerät beschränkt. Pipettier-Roboter anderer Bauart, insbesondere auch ein- oder mehrarmige Roboter können gemäß der vorliegenden Erfindung für das Verfahren angepaßt werden.

Für die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in den Reaktionsgefäßen je z.B. 10-50 mg Harz vorgelegt. Diese Menge Harz entspricht etwa 5-25 µmol Aminosäure bzw. ist für die Herstellung von etwa 5-25 µmol Peptid geeignet. Übliche Trägermaterialien auf Polystyrol- oder Polyacrylamidbasis sind verwendbar. Es ist zweckmäßig, Peptide aufzubauen, die maximal 30 Aminosäuren enthalten. Die dafür benötigten Reagenzlösungen und Waschflüssigkeiten werden in den dafür vorgesehenen Vorratsgefäßen vorbereitet. Der Arm des Pipettier-Roboters ist mit einer Dosierpipette

versehen. Die Synthese erfolgt nach dem im angeschlossenen PC vorgegebenen Programm. Damit erfolgt die Zudosierung sämtlicher Reagenzlösungen, die aus mit Teflon-Septen verschlossenen Vorratsgefäßen entnommen werden. Bevor die Dosierpipette von einer Reagenzlösung zu einer anderen wechselt, wird die Dosierpipette in einer speziellen Spülposition mit Lösungsmittel gespült. Analog werden die benötigten Waschflüssigkeiten eingebracht. Die Abspaltung des gewünschten Peptids vom Träger mit Trifluoressigsäure kann analog automatisch oder manuell ausgeführt werden.

Das Absaugen aller Flüssigkeiten aus den Reaktionsgefäßen der jeweiligen Umsetzung oder den Waschschriften erfolgt in allen Reaktionsgefäßen gleichzeitig durch die an die Haltevorrichtung angeschlossene Absaugvorrichtung (z.B. Wasserstrahlpumpe oder Membranpumpe).

Im allgemeinen wird DMF oder N-Methylpyrrolidon als Lösungsmittel eingesetzt. Dementsprechend müssen die Reaktionsgefäße und die eventuell vorgesehene Spülvorrichtung aus lösungsmittelbeständigem Material gefertigt sein, z.B. aus Glas, Polypropylen oder Teflon. In den handelsüblichen Geräten sind die Dosierpipetten aus Edelstahl gefertigt. Dieses Material ist für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

Das Verfahren wird zum Beispiel mit folgenden Mitteln ausgeführt (Mengenangabe pro Well): Ausgangsmaterial ist 10 mg mit Fmoc-Aminosäuren beladenes Harz (Korngröße 200-400 mesh); Fmoc geschützte Aminosäuren werden in bis zu 10 fachem Überschuß für jeden einzelnen Kupplungsschritt eingesetzt, d.h. 200 µl

einer DMF-Lösung von 50 μ mol Fmoc-Aminosäure und 50 μ mol 1-Hydroxybenzotriazol und 100 μ l einer DMF-Lösung von 75 μ mol N,N-Dicyclohexylcarbodiimid werden zugegeben; die Kupplungszeit beträgt ca. 1 Stunde. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt jeweils mittels 300 μ l einer 40%igen Lösung von Piperidin in DMF. Die Abspaltungszeit ist ca. 20 Minuten. Die Waschschritte werden mit jeweils 300 μ l DMF ausgeführt.

Das Acylieren von freien Gruppen (NH_2 , OH) kann analog durch Zugabe geeigneter Säureanhydride, z.B. Acetanhydrid und Pyridin, erfolgen. Nach Beendigung dieser Umsetzungen wird die Lösung abgesaugt und der Aufarbeitung zugeführt.

Die Abspaltung des fertigen Peptids vom Träger kann in den Reaktionsgefäßen erfolgen durch manuelle Zugabe von Trifluoressigsäure (20 Minuten Reaktionszeit). Die Peptide werden getrennt isoliert. Wie aus der obigen Erläuterung deutlich wird, werden alle Schritte der Peptidsynthese in offenen Gefäßen ausgeführt. Durch die erfindungsgemäße Ausführung der Synthese werden die Peptide trotzdem in sehr hoher Reinheit erhalten.

In den Figuren 1 bis 3 wird ein Beispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung schematisch gezeigt.

Figur 1 zeigt die Haltevorrichtung bestehend aus Wanne (2) und Deckel (1). Die Wanne (2) ist mit dem Deckel (1) fest verschließbar, vorzugsweise durch Schraubverschlüsse, die den Flansch der Wanne mit dem Deckel verbinden. Der Deckel (1) weist die Öffnungen (3) auf, die über die ganze Fläche in regelmäßigen

Abständen angeordnet sind. (In der Zeichnung ist nur ein Teil der Öffnungen gezeichnet.) In diese Öffnungen werden die Reaktionsgläser (4) gesteckt. Falls das Verfahren nur in weniger Reaktionsgefäßen ausgeführt wird als der Deckel Öffnungen aufweist, werden die unbenutzten Öffnungen durch Schliffstopfen verschlossen.

In der Wand der Wanne (2) sind 2 Anschlüsse (5) und (6) vorgesehen. Anschluß 5 ist an die Absaugvorrichtung angeschlossen, Anschluß 6 dient der Zufuhr von Inertgas.

Figur 2 zeigt den Querschnitt einer bevorzugten Ausführungsform der Haltevorrichtung. Diese enthält ein Leitblech 7, das wie ein zweiter Boden in die Wanne (2) knapp unterhalb des Anschlusses (5) angebracht ist. Es ist leicht abfallend zum Anschluß (5) hin angeordnet, so daß restloses Abziehen der abgesaugten Flüssigkeiten ermöglicht wird.

Figur 3 zeigt die schematische Darstellung eines Reaktionsgefäßes (4). Der obere Teil des Gefäßes ist zylindrisch. Der untere Teil des Gefäßes verjüngt sich und ist mit einem Schliff (9) fest verbunden. Die untere Öffnung des Reaktionsgefäßes ist durch eine Glasfilterfritte oder Teflonfilterfritte (8) abgedeckt.

In diesem Ausführungsbeispiel ist die Wanne (2) aus Metall (vorzugsweise V2a-Stahl), der Deckel (1) aus Teflon oder Polyamid 66, und die Reaktionsgefäß (4) aus Glas. Die Öffnungen (3) sind konisch und entsprechen genau der Größe der Schiffe (9) der Reaktionsgefäß. Die Filter (8) sind Glasfilterfritten G2 oder G3 oder Teflonfilterfritten der Firma G.T. Baker Chemikalien, DE-6080 Groß-Gerau, Bestellnummer

7329/03. Wenn die Vorrichtung zusammen mit dem Pipettierroboter der Firma TECAN, RSP 5052, verwendet wird, ist es zweckmäßig die Wanne (2) mit etwa den Maßen 165x127x45 (mm) herzustellen. Die Reaktionsgefäße haben dann eine Gesamthöhe von etwa 70 mm, von der etwa 25 mm auf den zylindrischen Teil oberhalb der Glasfilterfritte entfallen. Der Durchmesser dieses oberen Teils beträgt 13 mm. Es ist zweckmäßig die Vorrichtung für maximal 48 Reaktionsgefäße zu bauen.

Die Haltevorrichtung ist über den Anschluß 5 mit einer Absaugvorrichtung, z.B. einer Membranpumpe mit vorgeschalteter 5 l-Saugflasche verbunden. Ferner ist die Haltevorrichtung über den Anschluß 6 mit einer Inertgaszufuhr (z.B. Stickstoffflasche) verbunden. In dieser Leitung ist ein Überdruckventil (meist eingestellt auf etwa 0,1 bar) vorgesehen. Außerdem sind über z.B. einen PC-steuerbare Regelorgane in den Leitungen vorgesehen.

Eine Variante dieser Vorrichtung ist so gestaltet, daß die Wanne (2) nur einen Anschluß aufweist, der über ein PC-steuerbares Dreiwegventil mit den beiden Leitungen (Inertgas/Absaugvorrichtung) verbunden ist.

Das folgende Beispiel erläutert den Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahrens: Dabei wird die oben beschriebene Vorrichtung in Verbindung mit einem Pipettier-Roboter verwendet. Der Ablauf des Verfahrens ist computergesteuert. Trägermaterial, das bereits mit einer geschützten Aminosäure oder einem kurzen Peptid beladen ist, wird in den Reaktionsgefäßen vorgelegt.

Teil des Synthesecyclus:

Schritt	Vorgang
1 Ventil N ₂ auf, Vakuum zu	
2 Zudosieren von DMF 3 Min.	Wäscheln
3 Ventil N ₂ zu, Vakuum auf	Absaugen
4 Ventil N ₂ auf, Vakuum zu	
5 Zudosieren 40 % Piperidin im DMF	Schutzgruppen-
3 Min.	Abspaltung
6 Ventil N ₂ zu, Vakuum auf	Absaugen
7 Ventil N ₂ auf, Vakuum zu	
8 Zudosieren 40 % Piperidin im DMF	Schutzgruppen-
20 Min.	Abspaltung
9 Ventil N ₂ zu, Vakuum auf	Absaugen
10 Ventil N ₂ auf, Vakuum zu	
11 Zudosieren von DMF 30 Sek.	Waschen
12 Ventil N ₂ zu, Vakuum auf	Absaugen
13 Ventil N ₂ auf, Vakuum zu	
14-40 Wiederholung Schritte 11-13	Waschen 9x
41 Zudosieren der gewünschten	
Fmoc-Aminosäure/HOBt in DMF	1. Kupplung
42 Zudosieren DIC/DMF 40 Min.	1. Kupplung
43 Ventil N ₂ zu, Vakuum auf	Absaugen
44 Ventil N ₂ auf, Vakuum zu	
45-48 Wiederholung Schritte 41-44	2. Kupplung
49-78 Wiederholung Schritte 11-13	Waschen 10x

Verglichen mit dem Verfahren und der Vorrichtung gemäß der genannten deutschen Patentanmeldung Nr. P 38 28 576.2 ermöglicht die erfindungsgemäße Vorrichtung eine wesentliche Verkürzung (etwa Halbieren) der für den Synthesecyclus benötigten Zeit. Die Synthese erfolgt verlässlich und sauber, da die Absaugung der Flüssigkeiten vollständig erfolgt. Der Ablauf der Synthese kann leicht kontrolliert werden, da die Reaktionsgefäße offen sind.

Patentansprüche:

1. Vorrichtung zur simultanen Synthese mehrerer Polypeptide nach der Festphasensynthesemethode, die mehrere Reaktionsgefäße und eine Haltevorrichtung für die Reaktionsgefäße aufweist, wobei die Reaktionsgefäße oben und unten offen sind, die untere Öffnung der einzelnen Reaktionsgefäße durch einen Filter abgedeckt ist, die Haltevorrichtung ein schließbares Gefäß ist, das eine Anschlußmöglichkeit für eine Inertgasszuleitung und eine Absaugvorrichtung aufweist sowie Öffnungen, in denen die Reaktionsgefäße so befestigt werden, daß deren obere Öffnungen von oben für das Zugeben der im Syntheseverfahren benötigten Flüssigkeiten zugänglich sind und deren untere Öffnungen mit dem Innenraum der Haltevorrichtung in Verbindung stehen.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Haltevorrichtung aus einem wannenförmigen Gefäß mit plattenförmigem Deckel besteht, wobei der Deckel Öffnungen aufweist, in denen je ein Reaktionsgefäß gehalten wird.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsgefäße zylindrische Glasbehälter sind, die in ihrem unteren Teil einen Glasschliff aufweisen, der in die Haltevorrichtung eingesteckt wird.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Filter, die die unteren Öffnungen der Reaktionsgefäße abdecken, Glasfilterfritten oder Teflonfilterfritten sind.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Syntheseverfahren benötigten Flüssigkeiten durch einen Pipettier-Roboter in die Reaktionsgefäße eingebracht werden.
6. Verfahren zur simultanen Synthese mehrerer Polypeptide nach der Festphasensynthesemethode unter Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem polymeres Trägermaterial oder mit der ersten Aminosäure oder einem Peptid beladenes polymeres Trägermaterial in den Reaktionsgefäßen vorgelegt wird, dann nach der an sich bekannten Festphasensynthesemethode in den Reaktionsgefäßen die Peptide aufgebaut werden und gewünschtenfalls freie Aminogruppen und/oder Hydroxygruppen der Peptide acyliert werden, indem die für die einzelnen Schritte erforderlichen Reagenzien beziehungsweise Waschflüssigkeiten durch einen oder mehrere Roboterarm(e) mit Kanüle aus den entsprechenden Vorratsbehältern in die Reaktionsgefäße eingebracht werden und jeweils nach der benötigten Verweilzeit der Reagenzien beziehungsweise Waschflüssigkeiten die in den Reaktionsgefäße oberhalb der Filter befindlichen Flüssigkeiten über die Haltevorrichtung gleichzeitig abgesaugt werden,

wobei die einzelnen Schritte des Verfahrens durch das im Computer, der an den Roboter angeschlossen ist, vorgegebene Programm gesteuert werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß während des ganzen Syntheseverfahrens, ausgenommen sind nur die Phasen, in denen die Flüssigkeiten abgesaugt werden, Inertgas in die Haltevorrichtung eingeleitet wird, das unter so geringem Druck gehalten wird, daß es in den Reaktionsgefäßen das Durchsickern der Flüssigkeiten durch die Filter verhindert.

1/1

FIG. 1

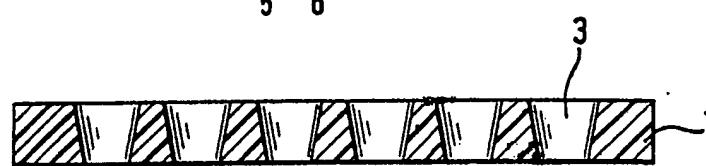
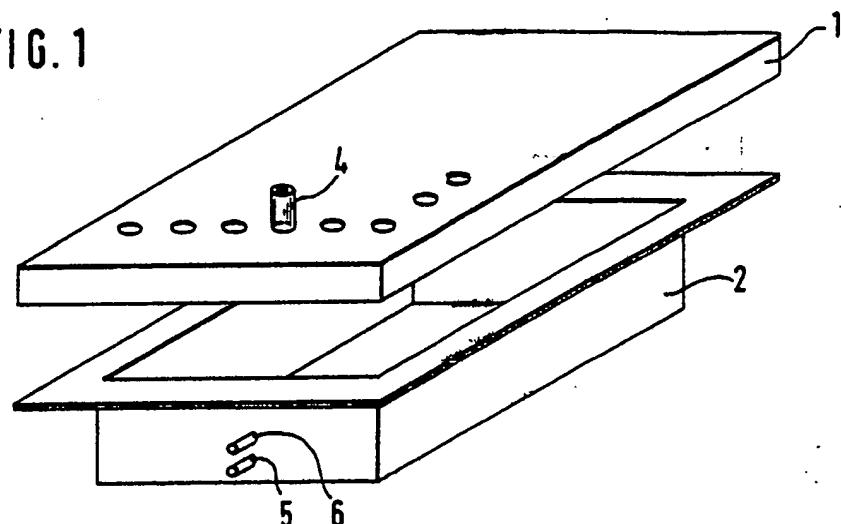


FIG. 2

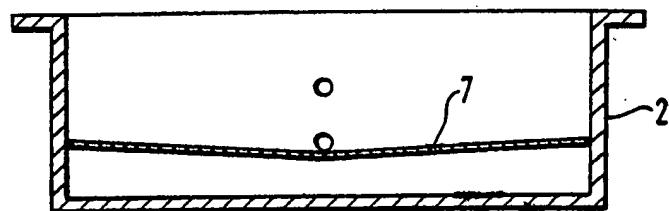
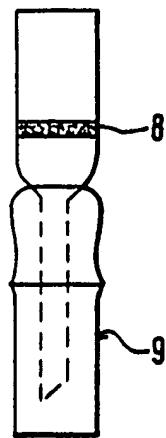


FIG. 3



ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/00318

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, Indicate all) ⁹

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl. ⁵ C 07 K 1/04

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. ⁵	C 07 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT¹⁰

Category ¹¹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
P, X	DE, A1, 3828576 (BOEHRINGER INGELHEIM KG) 8 March 1990 (08.03.90), see claim 1 ---	6
X	TETRAHEDRON; vol. 45, No. 24, 1989, G. SCHNORRENBERG et al. "Fully Automatic Simultaneous Multiple Peptide Synthesis in Micromolar Scale-Rapid Synthesis of Series of Peptides for Screening in Biological Assays", pages 7759-7764; see the whole document ---	1-6
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 82, No. 15, August 1985, R. A. HOUGHTEN "Gene- ral method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids", pages 5131-5135; see the whole document -----	6

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

7 May 1991 (07.05.91)

Date of Mailing of this International Search Report

5 June 1991 (05.06.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

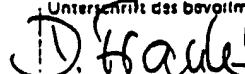
INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 91/00318

I. KLASSEKIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
C 07 K 17/04 5 Int.CI		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete Recherchierte Mindestpräzisität?		
Klassifikationssystem Klassifikationssymbole		
Int.CI. 5	C 07 K	
Recherchierte nicht zum Mindestpräzisität gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ³		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ²		
Art* !	Kennzeichnung der Veröffentlichung ^{1,2} , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Tafel 12	Betr. Anspruch Nr. 13
P, X	DE, A1, 3 828 576 (BOEHRINGER INGELHEIM KG) 08 März 1990 (08.03.90), siehe Patentanspruch 1. --	6
X	TETRAHEDRON, vol. 45, no. 24, 1989, G. SCHNORRENBERG et al. "Fully Automatic Simultaneous Multiple Peptide Synthesis in Micromolar Scale-Rapid Syn- thesis of Series of Peptides for Screening in Biological Assays" Seiten 7759-7764; siehe gesamtes Dokument. --	1-6
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 82, no. 15, August 1985,	6
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelddatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist: (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelddatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelddatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfundener Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfundener Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"g" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendetermin der internationalen Rechercheberichte	
07 Mai 1991	05.06.91	
Internationale Recherchebehörde	Unterschrift des bevoilimächtigten Beauftragten	
Europäisches Patentamt	D. Frank Mme Dagmar FRANK	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 91/00318

I. KLASSEFAKTION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (Bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) Nach der internationalen Klassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC K 17/04 Int.C1 5		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE Recherchierte Mindestprästoff ⁷ Klassifikationssystem : Klassifikationsymbole Int.C1. 5 C 07 K <small>Recherchierte nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soviel diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen</small>		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ Art ¹⁰ ! Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Tafel ¹² : Beitr. Anspruch Nr. ¹³		
P, X	DE, A1, 3 828 576 (BOEHRINGER INGELHEIM KG) 08 März 1990 (08.03.90), siehe Patentanspruch 1. -- X TETRAHEDRON, vol. 45, no. 24, 1989, G. SCHNORRENBERG et al. "Fully Automatic Simultaneous Multiple Peptide Synthesis in Micromolar Scale-Rapid Syn- thesis of Series of Peptides for Screening in Biological Assays" Seiten 7759-7764; siehe gesamtes Dokument. --	6
	A PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 82, no. 15, August 1985,	1-6
		6
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelddatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung beobachtet werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist: (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelddatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelddatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als nur oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 07 Mai 1991	Absendeadatum des internationalen Recherchenberichts 05.06.91	
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt		Unterschrift des bevoilichtigten Beauftragten  Mme Dagmar FRANK

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	<p>R. A. HOUGHTEN "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids" Seiten 5131-5135; siehe gesamtes Dokument.</p> <p>-----</p>	

ANHANG
zum internationalen Recherchen-
bericht über die internationale
Patentanmeldung Nr.

ANNEX
to the International Search
Report to the International Patent
Application No.

ANNEXE
au rapport de recherche inter-
national relatif à la demande de brevet
international n°

PCT/EP91/00318 SAE 44658

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obenge- nannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Diese Angaben dienen nur zur Unter- richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Office is in no way liable for these particulars which are given merely for the purpose of information.

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents de brevets cités dans le rapport de recherche inter- national visée ci-dessus. Les renseigne- ments fournis sont donnés à titre indica- tif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
DE-A1- 3828576	08-03-90	AU-A1-40130/89 DE-C2- 3828576 DK-A0- 4127/89 DK-A - 4127/89 EP-A2- 355582 EP-A3- 355582 JP-A2- 2167297 DE-U1- 8816749	01-03-90 22-11-90 22-08-89 24-02-90 28-02-90 22-11-90 27-06-90 21-06-90